Aus dem Hygienischen Institut der Universität Marburg.
Direktor: Professor Dr. W. Pfannenstiel.

Differential-Diagnose zwischen Pneumococcus Mucosus und Streptococcus Mucosus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Emmy Dix
Medizinalpraktikantin
aus Pont/Niederrhein.

Marburg/Lahn 1937

Buchdruckerei Thiele, Gütersloh i. Westf.

Aus dem Hygienischen Institut der Universität Marburg.
Direktor: Professor Dr. W. Pfannenstiel.

Differential-Diagnose zwischen Pneumococcus Mucosus und Streptococcus Mucosus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Emmy Dix
Medizinalpraktikantin
aus Pont/Niederrhein.

Marburg/Lahn 1937

Buchdruckerei Thiele, Gütersloh i. Westf.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
Marburg

am 21. April 37.

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Referent: Prof. Dr. W. Pfannenstiel.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Disposition.

A. 1. Über Artverschiedenheit und Arteinheit der Pneumo- und Streptococcen.

B. 1. Streptococcus mucosus und Pneumococcus mucosus in der Literatur.

B. 2. Haemolytische Streptococcen mit Schleimbildungsfähigkeit in der Literatur.

B. 3. Differentialdiagnostische Abgrenzungsmöglichkeiten zwischen Pneumococcus mucosus und Streptococcus mucosus.

I. Gestalt und Kapselbildung.
II. Kulturelles Verhalten auf festen und flüssigen Nährböden.
III. Resistenzprüfung. a) gegen Galle.
b) gegen Optochin.
IV. Tierpathogenität und Virulenzsteigerung.
V. Agglutination.

C. Eigene Versuche.
1. Verhalten der Stämme auf Blutagar.
2. Verhalten der Stämme auf flüssigen Nährböden.
a. Bouillon.
b. Milch.
c. Lackmusmilch.
d. Galle-Lackmus-Milch-Bouillon. (G.L.M.B.)
e. Aesculinbouillon.
3. Morphologische Gestalt.
4. Kapselbildung.
5. Mäusepathogenität.
6. Resistenzprüfung.
a. gegen Galle.
b. gegen Optochin.
7. Agglutination.
8. Versuche zur Wiedergewinnung verloren gegangener Schleimbildungsfähigkeit.

I. Züchtung auf künstlichen Nährböden.
a. Hammelblutserum.
b. Tarozzibouillon.
II. Tierpassagen.
a. Versuche mit Stamm 10 und 11.
b. Versuche mit Stamm 14, 15, 16, 17.
c. Versuche mit Stamm 18.
III. Züchtung im Mittelohr von Kaninchen.

D. Zusammenfassung.

E. Ergebnis.

Literaturverzeichnis.

Avery: J. amer. med. assoc. 96, 2062—2063 (1931).
Avery und Heidelberger: J. of med. 38, 81 (1923).
Avery und Heidelberger: J. of med. 42, 361 (1925).
Avery, Oswald, Dubos, René: J. of. exp. med. 54, 51—71 (1931).
Avery, Oswald, Dubos, René: J. of. exp. med. 54, 73—89 (1931).
Beitzke und Rosenthal: Arb. path. Institut. Berlin (1906).
Berger und Jacub: Z. f. Immun. 43, 233 (1925).
Bitter: D. med. Wo. 1298 (1922).
Braun, Jos.: Z. f. Hyg. 115, 3 (1933).
Cooper, Edwards, Rosenstein: J. ex. med. 49, 461 (1929).
Cooper, Rosenstein, Walter, Peizer: J. ex. med. 53, 531 (1932).
Eichhoff und Pfannenstiel: Bruns Beiträge zur kl. Chir. Bd. 151, S. 178 u. Bd. 152.
Engelmann: Zbl. f. Bakt. I. Orig. 89, 304 (1926).
Gundel: Typenlehre in der Mikrobiologie (1934).
Gundel: Erg. Hyg. 12, 132—267.
Gutmann: Z. f. Immun. 15, 625, H. 6 (1912).
Hilgermanns und Pohl: Arch. klin. Chir. 154, 256 (1929).
Hiss und Zinsser: Textbook of Bakt. New York, London (1927).
Koch, J.: Erg. d. Path. 13 (1909).
Kruse und Pansini: Z. f. Hyg. 11, 279.
Lehmann-Neumann: Bakt. Diagn. 7. Aufl. München (1927).
Lewy: Virchows Arch. 187, 327 (1907).
Lingelsheim, von: Hand. d. path. Mikroorgan. IV, 2, 802 ff. (1928).
Morgenroth: Berl. kl. Wo. 1829—1865 (1914) D. med. Wo. 388 (1916). Th. Mon. 95 (1912).
Morgenroth und Bumke: D. med. Wo. 538 (1914).
Morgenroth und Ginsberg: Berl. kl. Wo. 2183 (1912).
Morgenroth und Halberstädter: Berl. klin.Wo. 1559 (1911).
Morgenroth und Lewy: Berl. kl. Wo. 1560 und 1978 (1911).
Morgenroth, Schnitzer, Berger: Klin. Wo. 15, 653 (1923).

Nachmann: Zbl. f. Bakt. I. Orig. 77, 198.
Neufeld: Z. f. Hyg. 34, 454.
Neufeld und Händel: Bl. kl. Wo. 680 (1912).
Neufeld und Schiemann: Zbl. f. Bakt. 57 Beiheft 182.
Neufeld und Schnitzer: Handb. d. path. Mikroorg. IV, 2, 937 ff. (1928).
Oppenheimer: Zbl. f. Bakt. I. Orig. 111, 83 (1929).
Park: Amer. J. publ. Health. 18, 710 (1928).
Pilot und Davis: J. inf. Diss. 53, 29—37 (1933).
Reimann: J. of exp. med. 45, 1 (1927).
Rochs, K.: Virch. Arch. 220 (1915).
Rosenow: Zbl. f. Bakt. I. Orig. 73, 284 (1914).
Schiemann und Ishiwara: Z. f. Hyg. 77, 49 (1914).
Schottmüller: Münch. med. Wo. 909 (1903); 1425 (1905).
Sickles, Grace, Shaw: J. inf. Diss. 53, 38—43 (1933).
Silberstein: Zbl. Bakt. I. Orig. 41, 104 (1906).
Wamoscher: Z. f. Hyg. 106, 421 (1906).
Williams: Amer. J. publ. Health. 125 (1925).
Wirth, E.: Zbl. f. Bakt. I. Orig. 99, 266.
Wittmaack: D. med. Wo. 1271 (1906).
Wright: Lancet, Dez. 1912.

A. 1. Über Arteinheit oder Artverschiedenheit der Pneumococcen und Streptococcen.

Der ursprüngliche Name des Pneumococcus: Streptococcus lanceolatus pneumoniae besagt schon, daß die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen Pneumococcen und Streptococcen so groß sind, daß die frühesten Untersucher die Pneumococcen in die große Gruppe der Streptococcen einreihten.

Kruse und Pansini waren stets der Ansicht, daß beide Keime einer gemeinsamen Wurzel entstammen und daß fließende Übergänge zwischen beiden bestehen. „Es ist nicht zu leugnen, daß die durch die Variabilität des Pneumoc. sich ergebende Verwandtschaft zu den Streptococ. auf den Ursprung aller dieser Bakterien von einer einzigen, wahrscheinlich saprophytären Streptococcenform hinweist."

Diese Ansicht stützten sie hauptsächlich auf die Beobachtungen, daß ältere, längere Zeit auf künstlichem Nährboden gezüchtete Pneumoc. in Gestalt und Wachstum sich dem Streptoc. pyogenes nähern. Die Kulturen zeigten bei Virulenzverlust kürzere und längere Stäbchen, Semmelformen und hefeartige Gebilde. Alle diese Modifikationen verschwanden, wenn es gelang, durch Tierpassage die Virulenz des Stammes wieder zu steigern.

Im Laufe der Zeit sind zahlreiche mühevolle Untersuchungen, die teilweise von zufälligen Beobachtungen ihren Ausgang nahmen, angestellt worden, die alle diese engen Beziehungen zwischen Streptoc. und Pneumoc. experimentell zu beweisen suchen. Durch die künstlichen Umwandlungen, die vielen Autoren gelangen, wurde die Abgrenzungsmöglichkeit, ja selbst die Beständigkeit der einzelnen Arten sehr in Frage gestellt.

Neufeld und Schnitzer stehen auf dem Standpunkt, daß man auf Grund der mannigfaltigen Umwandlungsversuche, die von ihnen, ferner Schiemann, Christensen, Killian, Schnabel, Kasarnowsky und vielen andern vorgenommen wurden, an der engen Verbundenheit der beiden Arten nicht mehr zweifeln kann.

Besonders erwähnt sei hier von den Versuchen der von Rosenow. Ihm gelang es, haemolytische Streptoc. unter bestimmten Versuchsbedingungen, z. B. verschiedenen Salzkonzentrationen und

verschiedenen Sauerstoffspannungen über den Streptoc. viridans in einen typischen Pneumoc. zu überführen und diesen wieder in den haemolytischen Streptoc. zurückzuverwandeln.

Morgenroth, Schnitzer und Berger konnten Umwandlungen der Pneumoc. und Streptoc. in vitro sowie in vivo erzielen. Sie unterscheiden bei den Vorgängen das modifikationsbereite Vorstadium A, bei dem sich der Stamm noch als echter Pneumoc. erweist, ferner die avirulente Form B, die dem Streptoc. viridans gleich ist, und die virulente Form C, die alle Eigenschaften des haemolytischen Streptoc. besitzt.

Weitere Umwandlungsversuche stammen von Silberstein, Berger und Jacub, ferner von Engelmann.

Jos. Braun beschreibt u. a. Versuche mit Pneumoc., die er am hiesigen Institut anstellte, wobei diese unter bestimmten Bedingungen die Kennzeichen der Enterococcen annahmen.

Griffith und Reimann unterscheiden bei ihren Versuchen die sog. S-Form (smooth = glatt) der Pneumoc., die sie in die R-Form (rough = rauh) überführten. Letztere ist völlig avirulent und weist nicht mehr die Kennzeichen ihrer Art auf.

Gundel ist der Ansicht, daß alle Variabilitäten zwischen Streptoc. und Pneumoc. Überführungen von der S- in die R-Form sind und daß nie eine Veränderungen über die R-Form hinausging.

Er reiht die Pneumoc. und Streptoc. in eine einzige große Gruppe ein, betont aber die Notwendigkeit der Sondergruppierung der Pneumoc. — im Gegensatz zu Lehmann-Neumann, der die Eingliederung des Streptoc. lanceolatus in die Art der Pneumoc. sowie des Streptoc. in eine davon getrennte Streptococcenart als „botanische Ungeheuerlichkeit“ bezeichnet. Gundel aber erscheint der Pneumoc. wegen seiner Bedeutung als Krankheitserreger so wichtig, daß er diesen selbstverständlich in eine gesonderte Bakteriengruppe einordnet. „Diese Sonderstellung erscheint gegenüber Neumann-Lehmann auch deswegen berechtigt, weil man sehr wohl und mit Sicherheit Streptoc. der verschiedenen Typen und Pneumoc. voneinander unterscheiden kann“.

B. 1. Streptococcus mucosus und Pneumococcus mucosus in der Literatur.

Schottmüller beschreibt im Jahre 1903 als erster in Deutschland den Streptoc. mucosus. Er sondert ihn wegen des charakteristischen schleimigen Wachstums auf den Blutagarkulturen von dem Streptoc. pyog. hämol. und dem Streptoc. viridans ab und betrachtet ihn als besondere Streptococcenart. Er fand ihn bei den verschiedensten eitrigen Prozessen sowie bei croupöser Pneumonie.

Wittmaack glaubt in der Kapselfärbung mit wässriger Thioninlösung und in der Fliegenmadenform der Ketten ein sicheres Unterscheidungsmerkmal gegen Pneumoc. gefunden zu haben.

Die Beziehung des Streptoc. mucosus zum Pneumoc. ist stark umstritten worden. Nachdem aber nachgewiesen wurde, (Lewy), daß der Streptoc. muc. sich gegen Optochin wie ein Pneumoc. verhielt, und als die serologische Typendifferenzierung der amerikanischen Forscher zeigte, daß die meisten dieser Stämme zum Typ III der Pneumoc. gehören, trat eine entscheidende Wendung ein. Durch darauffolgende sehr zahlreiche Untersuchungen gelangte man fast allgemein zu der Erkenntnis, daß der sog. Streptoc. muc. doch dem Pneumoc. sehr nahe steht, ja sogar ein Typ desselben ist.

Williams, Park, sowie Hiß und Zinsser, Beitzke und Rosenthal, Lewy u. a. sehen den Streptoc. muc. als eine Varietät des Pneumoc. an. Williams und Park bezeichnen ihn als Streptoc. lanceolatus var. mucosus.

E. Wirth hält den Streptoc. muc. für eine Mutation des Pneumoc., die sich vielleicht infolge der besonderen Schleimhautverhältnisse im Organismus herausbildet.

Von Lingelsheim gibt an, daß der Streptoc. muc. dem Pneumoc. näher stehe als dem Streptoc. pyog. haemol.

J. Koch hebt ausdrücklich hervor, daß dieser Keim gemäß seinen Merkmalen zu den Pneumoc. gehöre und deshalb kein Grund vorhanden sei, ihn zu den Streptoc. einzureihen.

Neufeld und Schnitzer teilen ebenfalls die Ansicht, halten also die Bezeichnung Streptoc. muc. für irreführend, da der Keim doch alle Eigenschaften der Pneumoc. besitzt.

Auch Gundel verwirft ganz ausdrücklich die Benennung „Streptoc. muc." Für ihn gibt es nur den Pneumoc. muc.

B. 2. Haemolytische Streptococcen mit Schleimbildungsfähigkeit in der Literatur.

In der Literatur sind verschiedentlich Stämme beschrieben worden, die auf Blutagar schleimig wachsende Kolonien bilden, sich aber in ganz entscheidenden Merkmalen von dem Pneumoc. mucosus unterscheiden. Da derartige Stämme leicht eine Verwirrung betreffs der Eigenschaften des Pneumoc. muc. hervorrufen können und auch schon hervorgerufen haben, werden sie besonders erwähnt.

K. Rochs beschreibt einen Keim, den er aus Herzblut eines Kranken züchtete, der an einer Sepsis zugrunde ging; letztere ging von einer Mandelentzündung aus. Der Stamm wies alle Merkmale eines **haemolytischen Streptoc.** auf, hatte aber auch die Fähigkeit,

auf Blutagar ausgesprochen dicke, zusammenhängende **schleimige Beläge** hervorzurufen. Der Gestalt nach waren es gramfeste Coccen, die lange Ketten bildeten. Die Blutagarkulturen waren deutlich schleimig und wiesen starke Haemolyse auf; selbst die Agarkulturen zeigten tautropfenähnliche Schleimbildung. Auch für Mäuse bestand hohe Pathogenität. Das Schleimbildungsvermögen und die Fähigkeit des Keims, Haemolyse hervorzurufen, schwanden bei Fortzüchtung auf künstlichem Nährboden allmählich; sie konnten jedoch durch mehrere Tierpassagen wieder hervorgerufen werden.

Über eine ähnliche Form berichtet Bitter 1922. Er isolierte einen Stamm aus Ohreiter. Dieser zeigte weitgehend morphologische und kulturelle Übereinstimmung mit dem echten Pneumoc. muc., unterschied sich von diesem nur durch Haemolyse auf der Blutplatte, und außerdem war er Mäusen und Kaninchen gegenüber avirulent. Auch bei Fortzüchtung blieben sowohl Haemolyse als Schleimbildung konstant.

Außerdem beschreibt derselbe Autor Stämme, die er bei Erkrankungen der serösen Häute, besonders bei Pleuritis und Meningitis fand, die zu Beginn schleimiges Wachstum aufwiesen, später aber diese Eigenschaften einbüßten. Es gelang ihm sogar durch eine einzige Tierpassage einen solchen Stamm zum Verlust des Schleimbildungsvermögens zu bringen. Das hauptsächliche Unterscheidungsmerkmal gegen den Schottmüllerschen Streptoc. muc. war die fehlende Pathogenität gegen Mäuse.

Pilot und Davis beobachteten ebenfalls haemolytische Streptoc., die aus dem Eiter von Scharlachotitiden gezüchtet wurden, die in stark schleimigen Kolonien wuchsen und Kapseln bildeten. Bei fortgesetzter Züchtung auf Blutagar ging die Fähigkeit der Kapsel- und Schleimbildung verloren. Durch Mäusepassagen wurde sie wiedergewonnen. Die Autoren halten die Keime für Variationen oder Mutationen des Scharlachstreptoc.

Auch Gundel berichtet, daß er verschiedentlich im Laufe von zehn Jahren Stämme beobachtete, die aus eitrigen Prozessen gezüchtet wurden, die meistens gleich in der ersten Kultur eine ziemlich starke Haemolyse und zugleich schleimiges Wachstum zeigten. Er ist nicht der Meinung, daß es sich hier um eine besondere Art im Sinne Schottmüllers oder um einen besonderen Typ handle, da auch er feststellte, daß die Schleimbildung bei diesen Keimen allmählich während der Züchtung auf künstlichem Nährboden verloren ging. Er hält diese Erscheinungsform des Streptoc. für eine Anpassung an das Nährsubstrat im menschlichen Organismus, nur für eine Standortsvarietät.

Über einen Typus, der sich auch durch abnormes Verhalten auszeichnete, aber in vielem dem Typ III ähnlicher ist als die bisher

beschriebenen, erfahren wir von Oppenheim aus Zürich. Es handelte sich um 10 Stämme, deren Blutagarkolonien anfangs flache schleimige Ansiedlungen zeigten, ohne daß Haemolyse beobachtet wurde. Nach einiger Zeit stellte sich heraus, daß sobald die Schleimbildung verschwand, eine Haemolyse eintrat und daß der Keim auch sonst alle Eigenschaften des Streptoc. pyog. haem. besaß.

Es würde zu weit führen, alle Keime, die durch ihr abweichendes Verhalten gegenüber dem wahren Pneumoc. muc. auffielen und in der Literatur beschrieben wurden, aufzuzählen. Ein einheitliches Verhalten dieser Coccen in Bezug auf Konstanz der Schleimbildung ist nicht festzustellen. Man kann aber derartige Stämme nur ihres schleimigen Wachstums wegen nicht zu den Pneumoc. Typ III rechnen, sondern muß sie scharf von diesen abgrenzen.

B. 3. Differentialdiagnostische Abgrenzungsmöglichkeiten zwischen Pneumoc. mucos. und Streptoc. mucos.

Trotz der engen Beziehungen zwischen dem Pneumoc. mucos. und den Streptococcen kann in den meisten Fällen dank der im Laufe der Zeit ausgearbeiteten differentialdiagnostischen Untersuchungsmethoden eine Abgrenzung beider Arten gegeneinander durchgeführt werden, wenn auch die vorhin angeführte Variabilität der Pneumoc. eine Erschwerung der bakteriologischen Diagnostik darstellt.

Es werden im folgenden die Eigenschaften des Pneumoc. muc. dargestellt, und zwar besonders die, durch die er sich am auffälligsten gegen die Streptoc. unterscheidet:

I. Gestalt und Kapselbildung.

II. Kulturelles Verhalten auf:
   a. Blutagarplatte,
   b. Bouillon, (Ascitesbouillon),
   c. Milch,
   d. Lackmusmilch,
   e. Galle-Lackmus-Milch-Bouillon (G.L.M.B.),
   f. Aesculinbouillon.

III. Resistenzprüfung.
   a. gegen Galle und Na taurochol.,
   b. gegen Optochin.

IV. Tierpathogenität und Virulenzsteigerung.

V. Agglutination, von der letzten Endes die Diagnose abhängig zu machen ist.

I. Gestalt und Kapselbildung.

Die Gestalt des Pneumoc. muc. ist recht wechselnd und hängt zum großen Teil von dem jeweiligen Nährboden ab. Meist tritt er als Diplococcus oder in kurzen Ketten auf, vor allem in Agar und im Tierkörper. Dagegen bildet er in flüssigen Nährstoffen, wie Bouillon, gerne etwas längere Ketten. Fast stets ist zu erkennen, daß die Glieder der kurzen oder längeren Ketten zu zweien gelagert sind.

Auch die Größe des einzelnen Coccus schwankt. Einmal ist er mehr länglicher oder lanzettförmiger Gestalt, ein anderes Mal rundlich, fliegenmadenförmig.

Ein charakteristisches Merkmal des Pneumoc. muc. ist seine **Kapsel,** die ihn scheidenförmig umgibt. Diese ist zuweilen wieder in eine schleimige Masse eingeschlossen, die gegen die Umgebung nicht scharf umrissen ist.

Die Darstellbarkeit der Kapsel hängt von den jeweiligen Lebensbedingungen des Keimes ab. Am besten läßt sie sich in frischen Abstrichen von infizierten Menschen oder infizierten Versuchstieren nachweisen. Auch bei Pneumoc., die auf künstlichen Nährböden gezüchtet, vor allem solchen, die reich an Eiweiß sind, wie z. B. Blutseren, kann man die Kapsel nachweisen.

Es steht fest, daß bei jungen, kräftigen, unter den besten Lebensbedingungen gezüchteten Kulturen die Ausbildung der Kapsel am deutlichsten ist. Allgemein nimmt man an, daß die Kapsel als Schutzmaßnahme des Keimes anzusehen ist.

Durch Untersuchungen, die Avery und Heidelberger zum Zweck der Typendifferenzierung anstellten, erfahren wir, daß die Artspezifität des Pneumoc. auf den Bakterienproteinen, die Typenspezifität aber auf dem Kohlehydrat der Kapsel beruht.

Avery fand, daß die Virulenz mit der Kapselentwicklung verbunden ist. Fehlt diese Kapsel, so besteht die Möglichkeit, daß die Zelle durch den Phagocyten aufgelöst wird; ist eine Kapsel vorhanden, so ist die Zelle widerstandsfähig gegen die Phagocyten. Jede Kapsel eines Pneumoc. enthält ein Polysaccharid, das man von dem Polysaccharid eines anderen Pneumococcentypus durch Säure- und Stickstoffgehalt ferner durch Polarisation scharf abgrenzen kann.

Es ist nun — namentlich von amerikanischen Forschern — nach Enzymen gesucht worden, die die Kohlehydrate der Kapsel lösen. Avery, Oswald, Dubos, René gelang nach jahrelangem Bemühen die Züchtung eines Bazillus, der die Fähigkeit besaß, dem

betreffenden Nährsubstrat die spezifischen Kohlehydrate zu entziehen. Durch Autolyse und Filtration des Keimes erhielten sie ein Enzym, das auch eine spezifische Wirkung auf die Kohlehydrate des Typ III ausübt. Wurde davon etwa 1 ccm Mäusen intraperitoneal eingespritzt, so wurde eine Schutzwirkung selbst bei einer millionenfach tödlichen Dosis von Pneumoc. III noch festgestellt.

Ferner fanden Sickles, Grace und Shaw drei Bakterienstämme, die die spezifischen Kohlehydrate des Typ III zersetzten.

Es ist noch vieles über derartige Versuche berichtet worden, die alle als Ziel die Zerstörung der Kapsel hatten. Eines aber haben die Untersuchungen gezeigt, nämlich, daß die Kapsel — durch die in ihr vorkommenden Kohlehydrate — Trägerin der spezifischen Antigenwirkung ist. Die Kapsel stellt den entscheidenden Faktor für das Schicksal der Pneumococcen im Organismus dar; denn das Enzym, das in den Versuchen benutzt wurde, wirkte nicht heilend an und für sich, sondern es zerstörte die Kapsel und ermöglichte so die Phagozytose.

Daß aber das morphologische Bild und ev. der Kapselnachweis eines Coccus allein für die Diagnose Pneumococcus III oder Streptoc. entscheidend sind, wie R. Hilgermanns und W. Pohl annehmen, ist ein Irrtum, auf den schon Eichhoff und Pfannenstiel in ihrer Stellungnahme zu der Bemerkung Hilgermanns hinwiesen.

II. Kulturelles Verhalten auf festen und flüssigen Nährböden.

Der Pneumoc. III ist — im Vergleich zum Streptococcus — ein kulturell sehr anspruchsvoller Keim. Er wächst zwar auf Nährböden einfacher Zusammensetzung, aber nur sehr spärlich und schlecht. Ein viel üppigeres Wachstum zeigt er auf Blutagar oder in flüssigen Nährböden. Will man die ursprünglichen Eigenschaften des Pneumoc. auf viele Generationen erhalten und seine Virulenz nicht zu sehr herabmindern, so muß man ihn auf solchen Nährböden, die die besten Entwicklungsmöglichkeiten bieten, züchten.

a. Die Ansiedlungen des Pneumoc. muc. zeigen auf der **Blutagarplatte** bei 37° Bruttemperatur wie alle andern Pneumoc. und wie der Streptoc. viridans einen deutlich grünen Hof. Von letzterem unterscheidet er sich aber durch das üppige Wachstum der Kultur unter Ausbildung einer reichlich grauschwärzlichen Schleimmasse. Meist sind es glasige, wassertropfenartige erhabene Kolonien, die Linsengröße erreichen können, wenn sie isoliert zur Entwicklung kommen. Stehen mehrere Kolonien nebeneinander (Impfstrich), so bildet sich ein saftig schleimiger, fadenziehender Belag. Nach sieben

Stunden Bebrütung zeigen sie meist die üppigste Schleimbildung, während diese nach 24 bis 36 Stunden zum größten Teil wieder zurückgeht, und es bleibt manchmal nur eine zarte, eben sichtbare Haut übrig.

Auf der **Milchblutagarplatte** wächst er unter Gelbfärbung des Nährbodens mit grünlichem Rand.

b. Außer der Blutagarplatte sind es die flüssigen Nährböden, die die besten Lebensbedingungen für den Mikroorganismus darstellen.

In **Bouillon** gedeiht er bei 37° in 24 Stunden unter gleichmäßiger Trübung und bildet höchstens einen ganz geringfügigen fadenziehenden Bodensatz am Grunde des Reagensröhrchens.

Besser und unter stärkerer Trübung des Nährbodens gedeihen die Keime in Serum- oder **Ascitesbouillon.** Die Kulturen sind unter diesen Verhältnissen noch schleimiger.

Kohlehydrathaltige Nährböden greift der Pneumoc. III zuweilen nach etwa 48 Stunden an.

c. **Milch** säuert er und bringt sie meist innerhalb kurzer Zeit zur Gerinnung.

d. In der **Lackmusmilch** ruft er Rötung und Gerinnung hervor.

e. **Galle-Lackmus-Milch-Bouillon** (G.L.M.B.) wird durch den Pneumoc. nicht verändert.

f. **Aeskulin-Bouillon** wird nicht gespalten.

III. Resistenzprüfung.

a. Gegenüber **Galle** und **Natrium taurocholicum.**

Der Pneumoc. erweist sich der Galle gegenüber sehr empfindlich.

Neufeld (Handbuch) stellte fest, daß sowohl tierische Gallen (die von Kaninchen, Meerschweinchen, Hunden und Affen) wie auch menschliche Gallen die Fähigkeit haben, die Pneumoc. nicht nur abzutöten, sondern sie auch im Laufe ganz kurzer Zeit völlig aufzulösen, während die Streptoc. überhaupt nicht davon beeinflußt werden. Die spezifische Wirkung auf Pneumoc. ist den gallensauren Salzen zuzuschreiben.

Derselbe Autor beobachtete etliche Stämme, die nur teilweise durch Galle gelöst wurden; anfangs zeigten sie nur eine Verklumpung, die als Vorstadium einer spezifischen Beeinflussung durch Galle zu deuten ist. — Es handelt sich hier wahrscheinlich um die von Gundel erwähnten avirulenten Pneumoc., die sich nicht durch Galle noch durch Optochin beeinflussen lassen oder aber die angewandte Galle war nicht brauchbar, denn die tierischen Gallen sind

längst nicht immer wirksam und es bestehen stets große Schwankungen in der Wirkungsintensität, da ihre Zusammensetzung z. B. der Gehalt an gallensauren Salzen, an Schleim usw. stets wechselt. Man hat keinen Anhaltspunkt darüber, wieviel wirksame Substanz sie enthält.

Nach Neufeld hängt die Wirkung der Galle von der an Glycocoll und Taurin gebundenen Cholsäure ab. Es erwiesen sich nämlich Glycocoll und Taurin allein unwirksam. Die Salze der Glycochol- und Taurocholsäure und (nach Neufeld und Händel) auch die Cholalsäure zeigen denselben Einfluß auf Pneumoc., wie die Galle selbst.

Darum nimmt man zu Versuchszwecken nicht die tierische Galle, — wegen ihrer ungleichmäßigen Zusammensetzung —, sondern besser die Salze der Glycochol- oder Taurocholsäure. Diese kann man auch stets genügend vorrätig halten. Für gewöhnlich nimmt man Natrium tauroch., das die stärkste Wirkung hat.

b. Gegen **Optochin.**

Ein weiteres empfindliches Reagens ist die hohe Empfindlichkeit des Keimes gegenüber Optochin (Aethylhydrocupreïn). Die Wirkung dieses Abkömmlings der Chinarinde wurde zunächst nur von Morgenroth und Mitarbeitern im Tierexperiment festgestellt. Diese Autoren gaben an, daß der Pneumoc. schon durch ganz kleine Mengen Optochin, die für den Organismus noch völlig unschädlich wären, in ihrer Entwicklung gehemmt wurden. Sie beimpften Tiere zugleich mit einer tödlichen Menge Pneumoc.-Kultur und Optochin. Die Kontrolltiere, denen dieselbe Menge Pneumoc. eingespritzt wurde, gingen zugrunde, während die ersterwähnten am Leben blieben.

Erst später, unabhängig vom Tierversuch, fand Wright die starke bakterizide Wirkung des Optochins gegenüber den Pneumoc. Er stellte Reagensglasversuche an und kam zu dem Ergebnis, daß die Pneumoc. in einer Verdünnung von 1 : 800 000 nicht mehr zur Entwicklung kommen.

Neufeld und Schiemann wiesen dann nach, daß die Wachstumsbeeinflussung gewöhnlich zwischen den Konzentrationen von 1 : 600 000 bis 1 : 300 000 auftritt.

Schiemann und Ishiwara stellten weiter fest, daß die Streptococcen erst bei stärkeren Konzentrationen des Optochins etwa zwischen 1 : 10 000 bis 1 : 3 000 in ihrem Wachstum gehemmt werden.

Nach diesen Versuchen in vivo und in vitro lag es sehr nahe, das Optochin, dessen große Einwirkungskraft auf Pneumoc. klargestellt war, als systematisch angewandtes Diagnostikum zu benutzen.

Gutmann schlug zum ersten Mal die systematische Anwendung des Optochins im Tierversuch zu diagnostischen Zwecken vor.

G. Nachmann ermittelte durch Reagenzglasversuche den Verdünnungsgrad des Optochins, bei dem die Pneumococcen in ihrer Entwicklung gehemmt werden, während die Streptoc. in ihrem Wachstum nicht beeinflußt werden und legte diese, bei einer Konzentration von 1 : 500 000 bis 1 : 1 000 000 fest. Diese betreffende Optochinverdünnung zieht er zur Differentialdiagnose heran.

IV. Tierpathogenität und Virulenzsteigerung.

Wesentlich für die Diagnose ist der Tierversuch. Das für gewöhnlich angewandte Versuchstier ist die weiße Maus, da diese am empfänglichsten für Pneumoc. ist und der Pneumoc. eine außerordentlich **hohe Pathogenität** für sie besitzt. Von Wamoscher wurde nachgewiesen, daß selbst **einzelne** Pneumococcenzellen den Tod einer Maus hervorzurufen vermögen. 23,8% der Mäuse, denen ein einziger Pneumoc. eingeimpft wurde, gingen ein.

Für gewöhnlich genügt bei den weißen Mäusen die intraperitoneale Injektion eines kleinen Bruchteiles einer flüssigen Pneumoc.-Kultur, um den Tod der Maus an Septikaemie innerhalb von 2 bis 3 Tagen herbeizuführen. Diese Stämme müssen allerdings hoch virulent sein, d. h. sie müssen direkt aus menschlichen Krankheitsprodukten stammen, oder man impft diese einmal auf den hochwertigsten Nährboden und verwendet die frische Kultur. Aber trotzdem — wenn auch selten — findet man bei solchen frischen Kulturen weniger virulente Stämme, und dadurch erhält man durch den Infektionsversuch kein eindeutig klares Bild.

Will man Keime, die einige Zeit auf künstlichem Nährboden gezüchtet wurden, auf Tierpathogenität prüfen, so wird man feststellen, daß manche Stämme weniger virulent selbst einige avirulent geworden sind. Selbst auf den besten künstlichen Nährböden geht die Virulenz des Pneumoc. III allmählich verloren. Die einzige Möglichkeit zur **Erhaltung oder Steigerung der Virulenz** ist die **Tierpassage.** Zu diesem Zwecke injiziert man entweder regelmäßig das Herzblut einer infizierten Maus intraperitoneal der andern Maus, oder man wechselt zwischen Mäusepassage — optimalem künstlichen Nährboden — Mäusepassage usw.

V. Agglutination.

Als letztes und entscheidendes Merkmal des Pneumoc. muc. ist die Agglutination mit typenspezifischem Serum anzuführen, die man in jedem differentialdiagnostischen Falle ausführen sollte. Sie wird mit den Blutagarkulturen vorgenommen.

Die serologische Typendifferenzierung geht letzten Endes auf die klassischen Untersuchungen, die Neufeld und Händel über Pneumoc.-Heilserum anstellten, zurück. Weitere wertvolle Studien hierüber stellten die Untersucher des Rockefeller-Institutes (1912 bis 1920) an, und von ihnen wurde die heute so vereinfachte Methode der Agglutination als Standardmethode ausgearbeitet.

Man hat also die serologisch gut voneinander zu trennenden Typen: I, II und III zu unterscheiden. Ihnen wurde der Typ IV, der heute als Typ x bezeichnet wird, gegenübergestellt. Dem Typ x werden alle die Stämme zugezählt, die mit keinem der typenspezifischen Seren des Pneumoc. I, II oder III Agglutination eingehen. G. Cooper und Mitarbeiter am Parkschen Institut in New York teilten den Typ x in 29 Gruppen, die wiederum serologisch voneinander zu trennen sind.

Übersicht über die 19 untersuchten Stämme.

Lf. Nr.	Stamm-nummer	Beginn der Versuche	Herkunft des Stammes		
1	8057	1. II. 35	Ohrabstrich	Pneumoc. III	schleimig noch bei Abschluß der Versuche am 6. II. 36.
2	8177	1. II. 35	„	„ „	
3	11542	22. II. 35	„	„ „	
4	15569	23. III. 35	„	„ „	
5	17069	1. IV. 35	Pleurapunktat	„ „	
6	19467	16. III. 35	Rachenabstrich	„ „	
7	19491	15. VI. 35	„	„ „	
8	30548	14. VI. 35	Ohrabstrich	„ „	
9	31239	15. VI. 35	Pleurapunktat	„ „	
10	12984	13. VI. 35	Ohrabstrich	Streptoc. viridans mit vorübergehender Schleimbildung	
11	13836	13. III. 35	„		
12	29754	5. VI. 35	„		
13	10673	22. II. 35	Liquor	Streptoc. viridans ohne Schleimbildung (zum Vergl.)	
14	16685	30. III. 35	Ohrabstrich	Strept. haemol. m. vorübergehender Schleimbildung	
15	26240	22. V. 35	„	„ „	
16	27866	1. VI. 35	Pleurapunktat	„ „	
17	36178	5. VI. 35	Ohrabstrich	„ „	
18	37133	6. VI. 35	„	„ „	
19	10657	15. II. 35	„	Strept. haemol. ohne Schleimbildung (zum Vergl.)	

C. Eigene Versuche.

Die in der Tabelle aufgeführten 19 Stämme wurden systematisch nach den in B. 3 dargestellten Methoden durchuntersucht.

1. Verhalten der Stämme auf Blutagar.

Zuerst wurden die Kulturen auf eine **Blutagarplatte** gebracht. Dabei verhielten sie sich folgendermaßen:

Stamm 1: Üppiges grünlichschleimiges Wachstum. Nach einigen Tagen wird die Kultur dunkler.
Stamm 2: Schwärzlich grünliches schleimiges Wachstum mit stark gewellter Oberfläche.
Stamm 3: Üppiges schleimiges grünliches Wachstum.
Stamm 4: Grünlich schleimiges Wachstum.
Stamm 5: Grünlich weißschimmerndes schleimiges Wachstum.
Stamm 6: Stark schleimiges grünliches Wachstum.
Stamm 7: Üppig schleimiges grünliches Wachstum.
Stamm 8: Üppiges schleimig grünliches Wachstum.
Stamm 9: Üppiges schleimiges grünliches Wachstum.

Alle neun Kulturen hielten diese Beschaffenheit bei Überimpfung von einer Blutplatte auf die andere in Zwischenräumen von 3 bis 4 Tagen unveränderlich bei. Erst nach etwa drei Monaten, bei anderen Stämmen noch viel später, wurde die Schleimbildung allmählich etwas schwächer. Darauf wurden die Stämme in Blutserum überimpft. Nach 24stündiger Bebrütung wurde eine Öse der Blutserumkultur auf eine frische Blutplatte gebracht. Diese Kulturen wuchsen sofort wieder üppig schleimig. Der Stamm Nr. 6 wurde 10 Monate lang nur von Blutplatte zu Blutplatte überimpft und blieb bis zuletzt sehr schleimig.

Keiner der genannten neun Stämme verlor innerhalb der Beobachtungszeit (die bei den meisten dreiviertel Jahr, bei einzelnen Stämmen einige Monate mehr betrug) die Fähigkeit zur Schleimbildung, wenn sie auch wechselnd stark war.

Stamm 10: Grünlich schleimiges Wachstum. **Verlust der Schleimbildungsfähigkeit** nach 2 Monaten. Er stellte dann eine flache grünliche Kultur ohne Schleimbildung und ohne Haemolyse dar.
Stamm 11: Grünlich schleimiges Wachstum. **Nach 2 Monaten Verlust der Schleimbildungsfähigkeit.**
Stamm 12: Grünliche Kultur mit üppiger Schleimbildung, **Verlust der Schleimbildung** nach 2½ Monaten.

Diese drei Stämme sind aus später noch aufzuführenden Gründen den Streptococcen zuzurechnen.

Stamm 13: Stark grünlich wachsende flache Kultur, **stets ohne Schleimbildung.** (Zum Vergleich dieser echte Streptoc. viridans).

Stamm 14: **Haemolytische Kultur mit Schleimbildung.** Nach 2 Überimpfungen blieb nur die Haemolyse bestehen, während die Schleimbildung nie wieder auftrat.

Stamm 15: **Haemolytische Kultur mit Schleimbildung.** Schon bei der nächsten Überimpfung trat die Schleimbildung nicht wieder auf, während die Haemolyse bestehen blieb.

Stamm 16: **Flache haemolytische Kultur mit Schleimbildung,** die erst nach der 5. Überimpfung schwand.

Stamm 17: **Haemolytische Kultur** mit sehr starker **Schleimbildung.** Die einzelnen Kolonien waren tautropfenähnlich. Die Schleimbildung verlor sich erst nach 18 Tagen.

Stamm 18: **Haemolytische Kultur mit starker Schleimbildung.** Letztere ging nach drei Überimpfungen verloren.

Stamm 19: Farblose, flache, stark **haemolytische Kultur, stets ohne Schleimbildung.** (Der echte Streptoc. haemol. zum Vergleich herangezogen).

Zu bemerken ist noch, daß die Intensität der Schleimbildung sehr von der Beschaffenheit der Blutplatte, also von deren Zusammensetzung, deren Frische und von der Bebrütungszeit der Blutagarkulturen abhängt.

2. Verhalten der Keime auf flüssigen Nährböden.

a) Von der Blutagarplatte wurde je eine Öse jeder Kultur in ein **Bouillonröhrchen** hineingeimpft. Die Kulturen entwickelten sich nach 24 Stunden im Brutschrank wie folgt:

St. 1: Diffuse Trübung.
St. 2: Diffuse Trübung und fadenziehender Bodensatz.
St. 3: Diffuse Trübung und fadenziehender Bodensatz.
St. 4: Diffuse Trübung und geringer Bodensatz.
St. 5: Diffuse Trübung und geringer Bodensatz.
St. 6: Diffuse Trübung.
St. 7: Diffuse Trübung.
St. 8: Diffuse Trübung und geringer fadenziehender Bodensatz.
St. 9: Diffuse Trübung und geringer fadenziehender Bodensatz.
St. 10: Fadenziehender Bodensatz.
St. 11: Fadenziehender Bodensatz.
St. 12: Krümeliger Bodensatz.

St. 13: Krümeliger Bodensatz.
St. 14: Krümeliger Bodensatz.
St. 15: Krümeliger Bodensatz.
St. 16: Bei der ersten Beimpfung diffuse Trübung, bei der zweiten Beimpfung (nach 3 Tagen) nur krümeliger Bodensatz.
St. 17: Krümeliger Bodensatz.
St. 18: Krümeliger Bodensatz.
St. 19: Körniger Bodensatz

Zusammenfassend wäre über die Bouillonkulturen zu sagen, daß den ersten 9 Stämmen diffuse Trübung gemeinsam und einige noch geringen fadenziehenden Bodensatz aufwiesen, während die andern Stämme fast nur Bodensatz zeigten.

b) Das Verhalten der Stämme in **Milch.**

St. 1: Gerinnung nach 4 Tagen.
St. 2: „ „ 4 „
St. 3: „ „ 3 „
St. 4: „ „ 4 „
St. 5: „ „ 3 „
St. 6: „ „ 2 „
St. 7: „ „ 2 „
St. 8: „ „ 5 „
St. 9: „ „ 5 „
St. 10: nicht geronnen.
St. 11: nach 2 Tagen geronnen.
St. 12: „ 3 „ „
St. 13: „ 2 „ „
St. 14: nicht geronnen.
St. 15: „ „
St. 16: „ „
St. 17: „ „
St. 18: „ „
St. 19: „ „

c) Das Verhalten in **Lackmusmilch.**

St. 1: gerötet nach 24 Stunden.
St. 2: „ „ 24 „
St. 3: „ „ 24 „ und Gerinnung.
St. 4: „ „ 24 „ „ „
St. 5: „ „ 24 „ „ „
St. 6: „ „ 24 „ „ „
St. 7: „ „ 24 „ „ „
St. 8: „ „ 24 „ „ „
St. 9: „ „ 24 „

St. 10: gerötet nach 3 Tagen.
St. 11: „ „ 24 Stunden.
St. 12: „ „ 24 „
St. 13: „ „ 24 „
St. 14: „ „ 24 „
St. 15: keine Veränderung des Nährbodens.
St. 16: gerötet nach 24 Stunden.
St. 17: keine Veränderung des Nährbodens.
St. 18: keine Veränderung des Nährbodens.
St. 19: gerötet nach 24 Stunden.

d) Verhalten in **Galle-Lackmus-Milch-Bouillon.**
Keiner der 19 Stämme wuchs auf diesem Nährboden.

e) Verhalten in **Aeskulin-Bouillon.** Keiner der 19 Stämme spaltete das Aeskulin.

3. Morphologische Gestalt der Keime.

Um die morphologische Gestalt der vorliegenden Kulturen festzustellen, wurden sie mikroskopisch im hängenden Tropfen, der aus einer Bouillon-Kultur hergestellt wurde, untersucht.
St. 1: Lanzettförmige Diplococcen.
St. 2: Diplococcen und längere Ketten (zu zweien gelagert).
St. 3: Diplococcen neben 3- und 4er Gliedern.
St. 4: Doppelcoccen, nur zu zweien verbunden.
St. 5: Doppelcoccen, neben 4-, 6-, 8er Ketten.
St. 6: Diplococcen neben 4- und 6er Ketten.
St. 7: Doppelcoccen und lange Ketten.
St. 8: Doppelcoccen, vereinzelte Viererketten.
St. 9: Lanzettförmige Diplococcen.
St. 10: Lange Ketten.
St. 11: Lange Ketten.
St. 12: Sehr lange Ketten, und runde kleine Coccen.
St. 13: Coccen 2, 3 und 4 Glieder an einer Kette.
St. 14: Lange Ketten.
St. 15: Kurze Ketten.
St. 16: Kürzere und längere Ketten sehr kleiner runder Coccen.
St. 17: Lange Ketten.
St. 18: Lange Ketten.
St. 19: Lange Ketten kleiner runder Coccen.

Die ersten 9 Stämme zeigen die für Pneumococcen typische Doppelform.

4. Kapselbildung.

Der Nachweis eventuell vorhandener Kapseln konnte ganz vereinzelt schon im hängenden Tropfen der frischen Kulturen erfolgen. Um die Kapseln aber mit aller Bestimmtheit festzuhalten, wurden Ausstrichpräparate angefertigt. Für gewöhnlich genügte die Methylenblaufärbung (Löffler). Eine andere Methode ist folgende: Man fixiert den Ausstrich vorsichtig; dann gießt man eine 2%ige wässrige Gentianaviolettlösung darüber. Unter gleichzeitigem leichten Erwärmen läßt man die Farbe eine halbe Minute einwirken. Nach kurzem Spülen in Wasser entfärbt man das Präparat in einer 1—2%igen Essigsäurelösung für 6—10 Sekunden. Danach spült man das Präparat wieder in Wasser und trocknet es.

Da nun die jeweilige Ausbildung der **Kapsel** je nach dem Nährboden des Stammes schwankt, mußte man die frische Kultur auf die geeignetsten Nährböden bringen und das ist zweifellos das **lebende Nährsubstrat.** Es wurden also Mäusen die betreffenden Coccen intraperitoneal gespritzt. (Dieselben Tiere wurden zur Feststellung der Tierpathogenität der Pneumococcen und Streptococcen verwandt). Sobald die Tiere eingingen, mußten sie seziert werden, da nach nicht allzu langer Zeit die Colibazillen des Darmes ins Blut eindringen und eine Fäulniszersetzung eintritt. Die Sektion wurde steril vorgenommen, da nicht nur aus den inneren Organen: Herz, Milz und Niere Ausstrichpräparate angefertigt wurden, sondern es wurden von den infizierten Organen wieder Kulturen angelegt, um festzustellen, ob keine Veränderung im Tierkörper mit den injizierten Stämmen vorgegangen wäre.

Um die **Kapseln** auf **künstlichen Nährböden** nachzuweisen, wurde ein an Eiweiß besonders reicher Nährboden verwandt: Hammelblutserum. Ich impfte je eine Öse in das Serum. Sobald nach Bebrütung Trübung des Nährbodens eingetreten war, wurde die Kultur im hängenden Tropfen beobachtet und dann je eine Öse auf 2 Objektträger ausgestrichen, lufttrocken gemacht und gefärbt. Die Ergebnisse in Bezug auf Kapselbildung stimmten mit denen der Tierversuche überein.

St. 1: Lanzettförmige Diplococcen mit Kapselbildung.
St. 2: „ „ „ „
St. 3: „ „ „ „
St. 4: „ „ „ „
St. 5: „ „ „ „
St. 6: „ „ „ „
St. 7: „ „ „ „

St. 8: Lanzettförmige Diplococcen mit Kapselbildung.
St. 9: „ „ „ „
St. 10: keine Kapselbildung. Bei Wiederholung des Versuches nicht ganz sicher Kapseln festgestellt.
St. 11: keine Kapselbildung. Bei Wiederholung des Versuches Kapselbildung fraglich, jedenfalls nur schwache Kapseln.
St. 12: keine Kapselbildung.
St. 13: „ „
St. 14: „ „
St. 15: „ „
St. 16: „ „
St. 17: „ „
St. 18: „ „
St. 19: „ „

Die ersten 9 Stämme zeigen deutlich die den Pneumococcen eigene Fähigkeit zur Kapselbildung, während bei den zwei folgenden Stämmen diese Eigenschaft fraglich ist und den letzten diese ganz abgeht.

5. Mäusepathogenität.

Der vorhin erwähnte Tierversuch diente zugleich dem Zwecke, die hohe Tierpathogenität der Coccen in Vergleich zu den Streptococcen zu stellen. Es wurde eine Öse der Blutagarkultur in eine bestimmte Menge physiologischer Kochsalzlösung gebracht und bis zur gewünschten Konzentration weiter verdünnt.

Die im folgenden aufgeführten Dosen wurden intraperitoneal bzw. subkutan injiziert. Danach mußten die Tiere genau beobachtet werden.

Stamm	Dosis	
1	$^1/_{50}$ Öse intrap.	Tod nach 24 Stunden an Septikaemie. Bei der gleichfolgenden Sektion zeigte sich, daß das Peritoneum eine starke Schleimauflagerung trug.
2	$^1/_{50}$ „ „	Tod nach $1^1/_2$ Tagen.
3	$^1/_{100}$ „ „	Tod nach 2 Tagen.
4	$^1/_{20}$ „ „	Tod nach 1 Tag.
5	$^1/_{20}$ „ „	Tod nach 2 Tagen.
6	$^1/_{30}$ „ „	Tod nach $1^1/_2$ Tagen.
7	$^1/_{50}$ „ „	Tod nach 2 Tagen.
8	$^1/_{20}$ „ „	Tod nach 2 Tagen.
9	$^1/_{20}$ „ „	Tod nach 2 Tagen.
10	$^1/_{10}$ „ subkut.	Nach 5 Tagen getötet. In den Organausstrichen Kettencoccen und Diplococcen. Einer anderen Maus:

Stamm	Dosis			
10	1/2	Öse	intrap.	Tod nach 2 1/2 Tagen.
11	1/2	„	„	Tod nach 2 Tagen.
12	1/2	„	„	Tod nach 2 Tagen.
13	1/10	„	„	Nach 5 Tagen getötet. In den Organausstrichen vereinzelte Coccen.
14	1/2	„	„	Tod nach 1 1/2 Tag.
15	1/2	„	„	Nach 10 Tagen getötet. In den inneren Organen nur ganz vereinzelte Coccen.
16	1/2	„	„	Nach 10 Tagen getötet. In den inneren Organen keine Coccen.
17	1/2	„	„	Tod nach 1 Tag.
18	1/2	„	„	Tod nach 2 Tagen.
19	1/10	„	„	Tod nach 5 Tagen. In den inneren Organen vereinzelte Coccen.

Die Mäuse gingen also nach Injektion sehr kleiner Dosen der ersten 9 Stämme nach 1 bis 2 Tagen ein. Bei den folgenden Stämmen waren größere Dosen notwendig.

6. Resistenzprüfung.

a) Bei der Prüfung der Resistenz gegen **Galle** wurden die Versuche folgendermaßen angeordnet: Es wurden 0,1 ccm steriler Galle in ein Reagensglas gegossen, dazu 1,0 bis 2,0 ccm einer Bouillonkultur von Pneumococcen gebracht. Sodann wurde kräftig umgeschüttelt. Innerhalb von 3 bis 4 Minuten, meist aber erst nach längerer Zeit (15 bis 20 Minuten) wurden die Pneumococcen aufgelöst.

Es kann der Resistenzprüfung gegen Galle, wie schon angegeben, keine große Bedeutung beigelegt werden. Da sie in den ersten Versuchen immer negativ ausfiel, wurden die späteren Stämme gar nicht mehr daraufhin untersucht. Es wurde nur die Prüfung des Verhaltens gegenüber **Natrium taurochol.** fortgesetzt.

0,5 ccm einer 10%igen Nat. tauroch.-Lösung wurden mit einer 24stündigen Bouillonkultur versetzt und einige Male kräftig umgeschüttelt. Meist sah man gleich, zuweilen erst nach kurzer Zeit, daß die mit Natrium tauroch. versetzten Röhrchen eine Aufhellung zeigten und durchsichtig wurden. Besonders auffällig trat dies in Erscheinung, wenn Kontrollröhrchen, — die dieselbe Menge Pneumococcen-Bouillon-Kultur und sterile Bouillon enthielten, — zum Vergleich danebengehalten wurden.

In manchen Fällen, besonders, wenn die Kultur wenig bewachsen war, wurde die mikroskopische Untersuchung im hängenden Tropfen hinzugezogen. Während sich in den mit Natr. tauroch. versetzten Tropfen keine Pneumococcen mehr fanden, waren in den Tropfen

des Kontrollröhrchens noch massenhaft lebende Pneumococcen nachzuweisen.

St. 1: sofortige Aufhellung.
St. 2: sofortige Aufhellung.
St. 3: keine Aufhellung.
St. 4: heller geworden. Im hängenden Tropfen waren trotzdem noch deutlich Diplococcen zu erkennen.
St. 5: keine Auflösung.
St. 6: keine Auflösung.
St. 7: keine Auflösung.
St. 8: sofortige Aufhellung.
St. 9: sofortige Aufhellung.
St. 10: keine Auflösung.
St. 11—19: keine Auflösung.

Warum die Stämme 4, 5, 6 und 7 sich anders als die andern 5 Pneumococcenstämme verhalten, mit denen sie sonst fast alle Eigenschaften gemein haben, ist nicht geklärt.

b) Aufschlußreicher ist die Resistenzprüfung der Stämme gegen **Optochin.** Es wurden folgende Versuchsanordnungen getroffen: Zuerst wurde die Stammlösung (0,1 Optochin auf 500 Aqua dest.) hergestellt, verdünnt. Diese wurde 100fach mit Ascites-Bouillon (1 Teil Ascites, 2 Teile Bouillon) versetzt. Sodann bestand eine Konzentration von 1 : 5 000. Die Reagensgläser wurden zu fallenden Konzentrationen 1 : 5 000, 1 : 10 000, 1 : 50 000, 1 : 100 000, 1 : 500 000, 1 : 750 000, 1 : 1 000 000 gefüllt. — Es ist ratsam, die Ascitesflüssigkeit erst nach Sterilisation der verschiedenen Optochinlösungen im Dampftopf in die Gläser einzufüllen. — In jedes Röhrchen bringt man dann eine Öse einer 24stündigen Blutagarkultur und nach weiteren 24 Stunden Bebrütung wird das Wachstum der Kultur abgelesen.

Von den Stämmen, die in Optochin wuchsen, wurden — um die Identität des Stammes mit dem hineingeimpften Bazillus festzustellen und jegliche Verunreinigung mit einem fremden Stamm auszuschließen, — erst die mikroskopische Untersuchung im hängenden Tropfen und dann eine Blutagarplatte mit einer Öse der mit Optochin versetzten Kultur beimpft.

Auf den optochinhaltigen Kulturböden verhielten sich die Stämme wie folgt:

St. 1—9: kein Wachstum.
St. 10: bei der Konzentration 1 : 100 000 bis 1 : 1 000 000 gewachsen.
St. 11: in der Konzentration 1 : 50 000 bis 1 : 1 000 000 gewachsen.
St. 12: in der Konzentration 1 : 100 000 bis 1 : 1 000 000 gewachsen.
St. 13: in der Konzentration 1 : 10 000 bis 1 : 1 000 000 gewachsen.
St. 14: in der Konzentration 1 : 10 000 bis 1 : 1 000 000 gewachsen.

St. 15: in der Konzentration 1 : 10 000 bis 1 : 1 000 000 gewachsen.
St. 16: in der Konzentration 1 : 50 000 bis 1 : 1 000 000 gewachsen.
St. 17: in der Konzentration 1 : 10 000 bis 1 : 1 000 000 gewachsen.
St. 18: in der Konzentration 1 : 10 000 bis 1 : 1 000 000 gewachsen.
St. 19: in der Konzentration 1 : 10 000 bis 1 : 1 000 000 gewachsen.

Die ersten 9 Stämme weisen eine Entwicklungshemmung selbst bei den ganz geringen Konzentrationen auf, während die folgenden Stämme resistenter gegen Optochin sind.

7. Agglutination.

Entscheidend für die Bestimmung der Art der vorliegenden Stämme ist die Agglutination mit dem artspezifischen Serum. Es wurden auf einen Objektträger 1 Tropfen eines Serums von Typ I, ein Tropfen eines Serums von Typ II und 1 Tropfen des Serums von Typ III gebracht. In jeden dieser 3 Tropfen verrieb ich eine Öse einer Blutagarkultur. Bei stark schleimigen Kulturen mußte, ehe dieser Versuch vorgenommen werden konnte, die Blutplatte einige Tage stehen, damit die saftige Schleimbildung etwas zurückging, weil die sehr schleimigen Kulturen sich so gut wie gar nicht verreiben ließen. Dann aber gelang die Agglutination immer.
St. 1— 9: Agglutination mit Pneumococcenserum III.
St. 10—19: keine Agglutination mit den 3 Seren.

8. Versuche zur Wiedererlangung verlorengegangener Schleimbildungsfähigkeit.

I. Züchtung auf **künstlichen Nährböden.**

a. Die Stämme 10 und 11 wurden, nachdem sie das schleimige Wachstum eingebüßt hatten, in **Hammelblutserum,** einem Nährboden, der die beste Ernährungsmöglichkeit für die Stämme bietet, gebracht. Es trat nach Überimpfung auf die Blutagarplatte bei diesen Keimen **keine Schleimbildung** auf, während avirulent gewordene Kulturen der ersten 9 Stämme in Hammelblutserum sofort wieder schleimig wuchsen.

b. Wie aus der Tabelle ersichtlich, stammen die meisten Stämme von Ohrabstrichen. Da bei der Otitis media meist eine Luftverdünnung in den Mittelohrräumen auftritt, liegt es nahe, die Kulturen einmal auf ihr anaërobes Wachstum hin zu prüfen.

Alle Stämme wurden in **Tarozzi-Bouillon** gebracht. Keiner der Stämme unterschied sich in seinem anaëroben Wachstum von dem aëroben.

II. **Tierpassagen.** (Virulenzsteigerung).

a. Versuche mit Stamm 10 und 11.

Es wurde einer Maus je eine Öse der Kulturen — in NaCl aufgeschwemmt — intraperitoneal injiziert und die Tiere nach zwei Tagen getötet. Mikroskopisch stellte ich im Herzblut Streptococcen fest, deren Kulturen auf der Blutplatte keine Schleimbildung zeigten.

Einige Bluttropfen wurden in NaCl-Lösung gebracht und das Herz wurde mit einer sterilen Pinzette in derselben Lösung ausgepreßt. Von diesem Extrakt wurden 2,5 ccm einer Maus intraperitoneal eingeimpft. Als diese Mäuse nach zwei Tagen getötet wurden, waren keine Coccen in den inneren Organen oder im Herzblut nachzuweisen. Derselbe Versuch wurde wiederholt, nur die Injektionsdosis auf zwei Ösen erhöht. Bei der zweiten Passage waren auch jetzt keine Coccen mehr nachzuweisen. Man kann demnach annehmen, daß die Stämme 10 und 11 zu avirulent geworden waren, so daß sie für Mäuse selbst in hohen Dosen keine Pathogenität besaßen.

b. Virulenzsteigerungsversuche mit den Stämmen 14, 15, 16, 17.

Auch bei den haemolytischen Stämmen wurde eine Virulenzsteigerung durch zwei Mäusepassagen (je zwei Ösen) vorgenommen, ohne daß wieder die anfängliche Schleimbildung auftrat.

c. Versuche mit Stamm 18.

Dieser haemolytische Streptococcus war nach drei Überimpfungen nicht mehr schleimig. Nach zwei Mäusepassagen gelang es, den Stamm auf Blutagar wieder üppig schleimig zu machen. Die Kolonien waren tautropfenähnlich. Bei Überimpfungen von Blutagar zu Blutagar blieb die Kultur schleimig. Kurz nachdem sie den Brutschrank verlassen hatte, war die Haemolyse nur angedeutet. Erst bei längerem Stehen in Zimmertemperatur wurde die Kultur weniger schleimig und die Haemolyse stärker. Nach einem Monat war nur der Rand der Kultur noch etwas schleimig. Nach einem weiteren Monat fand sich keine Spur von Schleimbildung mehr. Man kann demnach zu der Annahme kommen, daß mit der Erhöhung der Virulenz, die hier durch die Tierpassage hervorgerufen wurde, die Fähigkeit einzelner Streptoc. zur Produktion von Schleimsubstanz einhergeht.

III. Züchtung im **Mittelohr von Kaninchen.**

Zur Prüfung, ob die Stämme 10 und 11, die ja von Ohrabstrichen herrührten und seit geraumer Zeit nicht mehr schleimig wuchsen, im Ohre selbst die Fähigkeit der Schleimproduktion wiedererlangen würden, wurden die Stämme ins Mittelohr von Kaninchen gebracht. Auch mit Stamm 19, dem echten haemolytischen Streptoc., wurde auf dieselbe Art verfahren, um festzustellen, ob er etwa an diesem Standort Schleim erzeugen würde. Es wurde das Trommelfell eines Kaninchens perforiert und 3 ccm NaCl-Lösung, die eine Öse der betreffenden Kultur enthielt, ins Mittelohr gebracht.

Stamm 10: Die ersten Abstriche (laufend an 6 Tagen) ergaben eine Reinkultur von Bakterien, die sich auf Blutagar genau so verhielten, wie die injizierten Kulturen. Der Abstrich am 7. Tage zeigte einen Stamm mit beginnender Schleimbildung. An den folgenden Tagen konnten aus dem Ohr keine Coccen mehr gezüchtet werden, da es abgeheilt war.
Der **Abstrich am 7. Tage** wurde genauer untersucht.
Bouillon: leichte Trübung.
Milch: nicht geronnen.
Lackmusmilch: leicht gerötet.
G.L.M.B.: unverändert.
Aeskulin: g e s p a l t e n.
Im Vergleich dazu wurde noch einmal von dem Injektionsmaterial etwas untersucht.
Bouillon: Bodensatz.
Milch: nicht geronnen.
Lackmusmilch: gerötet.
G.L.M.B.: unverändert.
Aeskulin: n i c h t g e s p a l t e n.

Stamm 11: Der erste Abstrich ergibt eine Reinkultur der Stammkultur.
Der zweite Abstrich (nach 3 Tagen) zeigt auf Blutagar einen Stamm, der ganz leichte Schleimbildung am Rand der einzelnen Kolonien zeigt. Nach zweimaliger Überimpfung blieb der Stamm immer noch etwas schleimig.
Bouillon: fadenziehender Bodensatz.
Milch: keine Gerinnung.
Lackmusmilch: schwach gerötet.

G.L.M.B.: unverändert.
Aeskulin: gespalten.
Zum Vergleich wieder die Stammkultur untersucht.
Bouillon: Bodensatz.
Milch: nicht geronnen.
Lackmusmilch: gerötet.
G.L.M.B.: unverändert.
Aeskulin: nicht gespalten.

In beiden Fällen, sowohl bei Stamm 10 wie 11, wurde entweder ein anderer Stamm aus dem Ohr gezüchtet als der, der hereingebracht wurde, oder der Streptoc. hat die Eigenschaften eines Enterococcus angenommen, denn die Spaltung des Aeskulins ist nur ein Merkmal der Enterococcen. (Beobachtungen über Auftreten oder Verlust von Aeskulinspaltungsvermögen auf alkalischen Nährböden bei Streptococcen siehe Eichhoff und W. Pfannenstiel).

Auffallend ist, daß die aus dem Ohr gezüchteten Enterococ. ganz leichte, schnell flüchtige Schleimbildung zeigten.

Stamm 19: Die Ohrabstriche an neun aufeinanderfolgenden Tagen ergaben immer wieder haemolytische Streptoc. Die Blutagarkulturen waren nie schleimig. Am 10. Tag war das Ohr abgeheilt.

D. Zusammenfassung.

I. Nach diesen Untersuchungen steht fest, daß es sich bei den ersten neun Stämmen um den Typ III der Pneumoc. handelt, denn sie wiesen auf der Blutagarplatte die charakteristische Schleimbildung und grünliches Wachstum auf, behielten das Schleimbildungsvermögen — bei guter Virulenz — unveränderlich bei, in den flüssigen Nährböden zeigten sie das für Pneumoc. typische Wachstum, im hängenden Tropfen stellten sie Diplococcen dar, bei allen konnte Kapselbildung und hohe Mäusepathogenität festgestellt werden sowie starke Beeinflussung des Wachstums durch Optochin schon in geringen Konzentrationen. Entscheidend für die Diagnose Pneumoc. III war die Agglutination mit Pneumococcenserum III.

II. Die Stämme 10, 11, 12 kann man dem Streptoc. viridans zurechnen. Die Stämme verloren nach 2 bis 2½ Monaten die Schleimbildungsfähigkeit und wuchsen wie der Streptoc. viridans, verhielten sich in flüssigen Nährböden wie echte Streptoc., stellten im hängenden Tropfen lange Ketten dar; die Kapselbildung war, wenn

überhaupt vorhanden, nur sehr schwach ausgebildet, die Mäusepathogenität war geringer als die der ersten neun Stämme, sie wurden erst durch höhere Optochinkonzentrationen beeinflußt und zeigten keine Agglutination mit Pneumococcenserum III. Das Schleimbildungsvermögen konnte durch Virulenzsteigerung und durch anaërobe Züchtung nicht wiedergewonnen werden. Bei Züchtung der Stämme 10 und 11 im Mittelohr von Kaninchen wurden im Abstrich Stämme gefunden, die beginnende Schleimbildung zeigten. Es ist aber fraglich, ob es sich um die hineingeimpften Stämme noch handelte.

III. Die haemolytischen Kulturen 14, 15, 16, 17, 18 verloren nach kurzer Zeit das Schleimbildungsvermögen, in den flüssigen Nährböden verhielten sie sich wie echte Streptoc., im hängenden Tropfen waren sie zu Ketten gelagert, nie wurden Kapseln gefunden, gegen Mäuse waren sie wenig pathogen. Durch Optochin wurden sie in ihrem Wachstum wenig beeinflußt und gingen keine Agglutination mit Pneumococcenserum III ein. Bei Stamm 18 gelang es durch Virulenzsteigerung nach zwei Mäusepassagen wieder Schleimbildung hervorzurufen.

E. Ergebnis.

Der Pneumoc. Typ III, genannt Pneumoc. muc., besitzt **allein** die Eigenschaft, Schleim zu produzieren und verliert — bei genügender Virulenz — diese Fähigkeit **nie.** Der Streptoc. viridans und auch die haemolytischen Streptoc. können **vorübergehend** Schleimbildungsvermögen besitzen.

Diese Fähigkeit der Streptoc. ist wohl als eine Anpassung an das jeweilige Nährsubstrat anzusehen, ferner hängt sie mit der Virulenz der Bakterien zusammen und ist als eine erhöhte Schutzmaßnahme des Bakterienorganismus anzusehen.

Lebenslauf.

Am 8. Februar 1911 wurde ich in Pont, Kreis Geldern am Niederrhein, geboren. Meine Eltern sind der Erbhofbauer Johann Dix und seine Ehefrau Anna, geborene Holland. Von meinem 6. bis 9. Lebensjahre besuchte ich die Volksschule zu Pont, von 1920 bis 1923 die Höhere Mädchenschule zu Geldern, von 1923 bis 1927 das Lyzeum zu Süchteln, 1927 bis 1930 das Oberlyzeum zu Lüdinghausen in Westfalen, wo ich am 17. 3. 30 die Reifeprüfung ablegte. In den ersten beiden Semestern studierte ich in Freiburg i. Breisgau, in den folgenden fünf in Marburg/Lahn, wo ich am 13. 8. 32 die ärztliche Vorprüfung bestand. Im Wintersemester 1933/34 besuchte ich die Universität Berlin, im Sommersemester 1934 die Universität Kiel. Zum Wintersemester 1934/35 kehrte ich an die Universität Marburg zurück, wo ich am 18. 1. 36 die ärztliche Staatsprüfung ablegte. Vom 15. 2. 36 bis zum 31. 4. 36 arbeitete ich als Medizinalpraktikantin an der Chirurgischen Universitätsklinik in Marburg, vom 1. 5. 36 bis zum 31. 9. 36 auf der Chirurgischen Abteilung der Städtischen Krankenhäuser in Potsdam und vom 1. 9. 36 bis 14. 2. 37 auf der ersten inneren Abteilung des Städtischen Hufeland-Hospitals Berlin-Buch.

Emmy Dix.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Freiburg: Professor Böker, Dr. Henkel, Professor Mie, Professor von Möllendorff, Professor Oltmanns, Professor Schüle, Professor Spemann, Professor Staudinger.

in Marburg: Professor Baur, Professor Claussen, Professor Dittler, Professor Eimer, Professor Flößner, Professor Göppert, Professor Grüter, Professor Grüneisen, Professor Hildebrand, Professor Jakobshagen, Professor Kehrer, Professor Klapp, Professor Klewitz, Professor Kutscher, Professor Meerwein, Professor Nauck, Professor Neumann, Professor Pfannenstiel, Professor Schwenkenbecher, Professor Versé, Professor Wiedhopf.

in Berlin: Professor von Bergmann, Professor Fieboes, Professor Frommolt, Professor Sauerbruch, Professor Stoekkel.

in Kiel: Professor Heine, Professor Rominger, Professor Seiffert, Professor Stertz, Professor Ziemke.